

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 2 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2009～2011

課題番号：21249037

研究課題名（和文）血中全蛋白MRM・MS解析とマイクロRNA網羅解析の革新と難治癌病態診断への応用

研究課題名（英文）MRM・MS and microRNA profiling analyses of blood samples and their clinical applications for development of molecular diagnostics

研究代表者

高橋 隆 (TAKAHASHI, TAKASHI)

名古屋大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：50231395

研究成果の概要（和文）：血中全蛋白MRM・MS解析とマイクロRNA網羅解析の革新と難治癌病態診断への応用

膵臓癌などの難治癌を対象にその早期発見による治癒率向上を可能とする革新的分子診断法の開発を目指した研究を進めた。健康人血清に比して膵臓癌症例において有意に高発現を示すマイクロRNAを4種類同定し、weighted-voting法による膵臓癌診断用判別モデルの構築を進めた結果、リスクスコアに基づき高い精度と特異度を持つ診断システムとして完成させることができた。特筆すべきことに、比較的早期の症例も含まれていたが、進行例と遜色無い頻度で異常値として検出することができた。また、膵臓癌及び正常主膵管組織の新鮮凍結組織において発現を検出した、約4000種類の蛋白からマーカー候補蛋白の探索を遂行し、高発現している蛋白の一つが膵臓癌細胞への小胞体ストレス耐性付与に関わることを明らかとした。

研究成果の概要（英文）：MRM・MS and microRNA profiling analyses of blood samples and their clinical applications for development of molecular diagnostics

We aimed to establish novel molecular diagnostic means for “hard-to-cure” cancers such as pancreatic cancer. We successfully identified four miRNAs present at high levels only in sera of pancreatic cancer patients but not in those of healthy individuals, which allowed us to develop diagnostic classifiers for pancreatic cancers based on the expression profiles. In addition, we have successfully catalogued 40,000 proteins from normal and pancreatic cancer tissues, which should serve as valuable basis for identification of biomarkers of pancreatic cancer. Interestingly, we identified one such protein, high expression of which appeared to confer resistance to endoplasmic reticulum stress in pancreatic cancer.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	13,000,000	3,900,000	16,900,000
2010年度	11,700,000	3,510,000	15,210,000
2011年度	7,800,000	2,340,000	10,140,000
総計	32,500,000	9,750,000	42,250,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・臨床検査学

キーワード：分子診断、網羅的発現解析、プロテオミクス、マイクロRNA

1. 研究開始当初の背景

近年、マイクロRNAと呼ばれる極小のRNA分子が、蛋白への翻訳を介さずに直接機能を担っていることが明らかとなってきた。したがって、ヒトゲノム情報の読み出し異常が蓄積した結果ともいえる癌の的確な病態把握には、実際に機能を担う蛋白とマイクロRNAの両者の発現異常を網羅的に検出することが極めて重要と考えられるが、臨床においては依然として単一のマーカー蛋白が病態の推定に用いられている。

2. 研究の目的

本研究の目的は、我々の研究グループが持つ、プロテオミクス解析分野とマイクロRNA研究分野における先進性を最大限に活用し、転換期を迎えた分子診断分野に革新をもたらすべく、1) 血液中に存在する蛋白とマイクロRNAの網羅的かつ選択的な定量的発現解析を可能とする技術的基盤を確立し、2) 日本人の血液中に存在する蛋白とマイクロRNAの発現プロファイルの詳細をデータベース化することにある。さらに、本研究は、これらの検討を通じて得られた成果をもとに、3) 代表的な難治癌である膵臓癌、胆道癌及び卵巣癌などの腹部深部臓器癌を主たる対象に、発現プロファイルを基にしたスクリーニングや抗腫瘍薬感受性予測を可能とする、難治癌の革新的分子診断法の開発として結実させることを最終的な目標とする。

3. 研究の方法

健常人血液及びがん患者血液検体を用いたマイクロRNAの網羅的な発現解析を、TaqManプローブのlow density arrayを用いた定量的RT-PCRによって行う。得られた網羅的で定量的な発現解析データに対し、汎用性確保に留意した綿密なバイオインフォマティクス解析を遂行し、癌の血液診断のための判別モデルを構築する。

また、三連四重極型MS解析装置を用いたmultiple reaction monitoring (MRM)法によるMS解析手法を応用し、血中に存在する腫瘍由来の全蛋白を一度に選択的且つ網羅的に定量解析するシステムを確立する。本研究課題では、まずMRM法のボトルネックの解消のために、血中に存在する個々の蛋白を個別的に、一つ一つチャンネル設定をしていく。同時に並行して、酵素消化後の安定同位体ラベルによる標識法と、多次元ナノ液体クロマトグラフィー(LC)とタンデム型MS解析装置を組み合わせ、最新の網羅的で定量的なMS解析手法を用いて、腫瘍組織或いは細胞株において癌特異的な或いは抗腫瘍薬感受性と関連して発現変動を示す蛋白を徹底的にデータベース化する。得られたデータをも

とに、血中に存在する可能性が高い蛋白を絞り込み、MRM解析の標的蛋白とする。

4. 研究成果

本研究は、血液中に存在する蛋白とマイクロRNAの網羅的かつ選択的な定量的発現解析を可能とする技術的基盤を確立し、膵臓癌などの難治癌を対象にその早期発見による治癒率向上を可能とする革新的分子診断法を開発することを目的として計画した。そのために、まず血液中からのマイクロRNAの抽出法の最適化を行い、最終的には100 μ lから高品位なマイクロRNAを含有する40-100ngのRNAを抽出できるプロトコルを確立した。また、TaqManプローブを貼付した低密度アレイを用いた定量的RT-PCR法の実験条件の最適化を進めることによって、当初200ngを要した解析を6ngという極微量を用いて解析可能とすることに成功した。これらの条件を用いて健常人血清におけるマイクロRNAについて詳細な検討を加えて、健常人血清中で検出限界以下のマイクロRNAのカタログ化を図った。

さらに、膵臓癌40症例の血清を対象にマイクロRNAの網羅的発現解析を進め、健常人血清においては検出限界以下であり、一方膵臓癌症例においては高頻度に検出される1種類のマイクロRNAと、逆に健常人でのみ検出される3種類のマイクロRNAの同定に成功した。また、健常人と膵臓癌症例の双方で発現が検出されるが、それらの平均値が有意差を示すマイクロRNAについても探索を行い、健常人に比して膵臓癌症例で2倍以上高い或いは低い発現を示すマイクロRNAとして、それぞれ6種類と5種類を同定した。このうち、3種類のマイクロRNAについては、癌における平均値が健常人に比して4倍以上高かった。さらに、これら3種類のマイクロRNAについては個々にTaqMan RT-PCR解析による検証を行い、良好な再現性を持って健常人と膵臓癌症例間に高い有意性 (1×10^{-9} 以上)を持つ差異が存在することを確認した。

健常人血清に比して膵臓癌症例において有意に高発現を示すマイクロRNA4種類について、さらに詳細な検討を加えた。これらの4種類のマイクロRNAについて、個々にTaqMan RT-PCR解析による検証を、健常人血清10サンプルと膵臓癌患者血清40サンプルを用いて行った。さらに、得られた解析データをもとにこれらの複数のマイクロRNAを組み合わせ用いる膵臓癌診断判別モデルの構築を進めた。weighted-voting法による判別モデルを作成し、リスクスコアにもとづいた診断シス

テムとして完成させた。その結果、カットオフ値を超える高値を示した健常者は10%であり、極めて良好な特異性を示した。一方、膵臓癌症例の82.5%がカットオフを上回る値を示し、極めて高い感度を持つことが明らかとなった。また、特筆すべきことに、検討した膵臓癌症例には比較的早期のII期の症例も含まれていたが、全く遜色ない頻度で異常値として検出することができた。現在、さらにI期症例を含む多数検体の解析による有用性の検証を進めるべく試料の収集を進めており、本研究において構築した基盤を元に、さらに多数例を用いた検証実験を進めて、できる限り早期に論文化と特許化を進めたいと、臨床に還元したいと考えている。

血清中に存在する蛋白に関する網羅的な定量発現解析に関しては、三連四重極型MS装置を用いたMRM法を応用して、血液中マーカータンパク質の精密検出法を確立することを目的として、まず開発ワークフローの最適化を進めた。膵臓癌細胞株試料より抽出したタンパク質試料を酵素消化後、安定同位体標識したレポーター試薬(iTRAQ試薬)を用いて標識化し、タンデム型MSを用いた解析により、約1000種類のタンパク質に関する発現・構造情報を取得した。それらの情報を基にして、発現量の異なる(高濃度、中等度)タンパク質を対象に、MRM解析に必要なチャンネル設定を行い、精密定量解析の条件設定の最終調整まで進めた。その過程においてiTRAQ標識を加えることによる検出感度向上が確認され、結果的に定量精度の向上にもつながることが明らかとなった。

さらに、膵臓癌マーカー候補タンパク質の網羅的発現情報の取得を進め、一度の試料調整により約3000-5000種類のタンパク質に関して比較定量が可能なシステムを確立した。さらに、最適化した開発ワークフローに従って、血液中マーカー候補タンパク質の特定を進め、膵臓癌及び正常主膵管組織の新鮮凍結組織から抽出したタンパク質を解析試料とした網羅的タンパク質発現プロファイリングを進めて、約4000種類のタンパク質の発現情報を取得し、癌と正常組織間に平均+2SD以上の大きな発現差を認める80種類のマーカー候補タンパク質の存在を明らかとした。

その結果、高発現している候補蛋白の中の一つが膵臓癌細胞の生存に直接関わることを明らかとし、膵臓癌細胞が微小環境下で晒されている小胞体ストレスへの耐性の付与に関わっていることを明らかとした。さらに、血清マーカーとしての有用性について、三連四重極型質量分析装置を用いたMultiple Reaction Monitoring法

を応用した検討を引き続き遂行中である。可及的早期の論文化及び特許化を目指したい。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計27件・全て査読あり)

- 1 Yamaguchi T, Yanagisawa K, Sugiyama R, Hosono Y, Shimada Y, Arima C, Kato S, Tomida S, Suzuki M, Osada H, Takahashi T. NKX2-1/TTF1/TTF-1-induced ROR1 is required to sustain EGFR survival signaling in lung adenocarcinoma. **Cancer Cell** (in press).
- 2 Hosono Y, Yamaguchi T, Mizutani E, Yanagisawa K, Arima C, Tomida S, Shimada Y, Hiraoka M, Kato S, Yokoi K, Suzuki M, Takahashi T. MYBPH, a transcriptional target of TTF-1, inhibits ROCK1, and reduces cell motility and metastasis. **EMBO J** 31: 481-493, 2012.
- 3 Endo M, Nakano M, Kadomatsu T, Fukuhara S, Kuroda H, Mikami S, Hato T, Aoi J, Horiguchi H, Miyata K, Odagiri H, Masuda T, Harada M, Horio H, Hishima T, Nomori H, Ito T, Yamamoto Y, Minami T, Okada S, Takahashi T, Mochizuki N, Iwase H, Oike Y. A critical role for tumor cell-derived angiopoietin-like protein 2 in metastasis. **Cancer Res.** 2012 (in press).
- 4 Nishikawa E, Osada H, Okazaki Y, Arima C, Tomida S, Tatematsu Y, Taguchi A, Shimada Y, Yanagisawa K, Yatabe Y, Toyokuni S, Sekido Y, and Takahashi T. miR-375 is activated by ASH1 and inhibits YAP1 in a lineage-dependent manner in lung cancer. **Cancer Res.** 71:6165-6173, 2011.
- 5 Matsuyama, Y., Suzuki, M., Arima, C., Huang, Q.M., Tomida, S., Takeuchi, T., Sugiyama, R., Itoh, Y., Yatabe, Y., Goto, H. and Takahashi, T. Proteasomal non-catalytic subunit PSMD2 as a potential therapeutic target in association with various clinicopathologic features in lung adenocarcinomas. **Mol. Carcinog.** 50: 301-309, 2011.
- 6 Shimamura, T., Imoto, S., Shimada, Y., Hosono, Y., Niida, A., Nagasaki, M., Yamaguchi, R., Takahashi, T., Miyano, S. A novel network profiling analysis reveals system changes in

- epithelial-mesenchymal transition. **PLoS ONE** 6: e20804. doi:10.1371/journal.pone.0020804, 2011
- 7 Sides, M., Klingsberg, R.C., Shan, B., Gordon, K.A., Nguyen, H.T., Lin, Z., Takahashi, T., Flemington, E.K., and Lasky, J.A. The Epstein-Barr virus LMP 1 and TGF- β 1 synergistically induce EMT in lung epithelial cells. **Am. J. Resp. Cell Mol. Biol.** 44:852-862, 2011.
 - 8 Attoub S, Hassan AH, Vanhoecke B, Iratni R, Takahashi T, Gaben AM, Bracke M, Awad S, Kamalboor JA, Al Sultan MAH, Arafat K, Gespach C and Petroianu G. Inhibition of cell survival, invasion, tumor growth and histone deacetylase activity by the dietary flavonoid luteolin in human epithelioid cancer cells. **Eur. J. Pharmacol.** 651: 18-25, 2011
 - 9 Mulder, J.E., Brien, J.F., Racz, W.J., Takahashi, T. and Massey, T. Mechanisms of amiodarone and desethylamiodarone cytotoxicity in non-transformed human peripheral lung epithelial cells. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 336:551-559, 20011.
 - 10 Travis WD, Brambilla E, Noguchi M, Nicholson AG, Geisinger KR, Yatabe Y, Beer DG, Powell CA, Eiely GJ, Van Schil PE, Garg, K, Austin JHM, Asamura H, Rusch, VW, Hirsch FR, Scagliotti G, Misudomi T, Huber RM, Ishikawa Y, Jett, J, Sanchez-Cespedes, M, Sculier, JP, Takahashi T, Tsuboi, M, Vansteenkiste J, Wistuba I, Yang, P-C, Aberle D, Brambilla C, Flieder D, Franklin W, Johnson B, Johnson D, Kerr K, Kuriyama K, Lee JS, Miller VA, pertersen I, Roggli V, Rosell R, Saijo N, Thunnissen E, Tsao M, Yankelewitz D. International Association for the Study of Lung Cancer/American Thoracic Society/European Respiratory Society International Multidisciplinary Classification of lung adenocarcinoma. **J Thorac. Oncol.** 6: 244-285, 2011.
 - 11 Yanagisawa K, Konishi H, Arima C, Tomida S, Takeuchi T, Shimada Y, Yatabe Y, Mitsudomi T, Osada H, and Takahashi T. Novel metastasis-related gene CIM functions in the regulation of multiple cellular stress response pathways. **Cancer Res.** 70:9949-58, 2010.
 - 12 Tanaka, S., Cao, K., Niimi, A., Limsirichaikul, S., Huang, Q., Nakamura, N., Murate, T., Hasegawa, Y., Takahashi, T. and Suzuki M. Functions of base selection step in human DNA polymerase alpha. **DNA Repair** 9:534-541, 2010.
 - 13 Huang, Q.A., Tomida, S., Masuda, Y., Arima, C., Cao, K, Kishahara, T., Osada, H., Yatabe, Y., Kamiya, K., Takahashi, T., and Suzuki, M. Regulation of DNA polymerase POLD4 influences genomic instability in lung cancer. **Cancer Res.** 70:8407-8416, 2010.
 - 14 Huang, Q.A., Akashi, T., Matsuda, Y., Kamiya, K., Takahashi, T. and Suzuki, M. Roles of POLD4, smallest subunit of DNA polymerase δ in nuclear structures and genomic stability of human cells. **Biochem. Biophys. Res. Comm.** 391:542-546, 2010.
 - 15 Hu Q, Akatsuka S, Yamashita Y, Ohara H, Nagai H, Okazaki Y, Takahashi T, and Toyokuni S. Homozygous deletion of CDKN2A/2B is a hallmark of iron-induced high-grade rat mesothelioma. **Lab. Invest.** 90:360-373, 2010.
 - 16 Heishi, T., Hosaka, T., Suzuki, H., Suzuki, Y., Miyashita, H., Oike, Y., Takahashi, T., Nakamura, T., Arioka, S., Mitsuda, Y., Takakura, T., Hojo, K., Matsumoto, M., Yamauchi, C., Ohta, H., Sonoda, H., and Sato, Y. Endogenous angiogenesis inhibitor vasohibin1 exhibits a broad-spectrum anti-lymphangiogenic activity and suppresses lymph node metastasis. **Am. J. Pathol.** 176:1950-1958, 2010.
 - 17 Sadej R, Romanska H, Kavanagh D, Baldwin G, Takahashi T, Kalia N, Berditchevski F. Tetraspanin CD151 regulates TGF- β signalling: implication in tumour metastasis. **Cancer Res.** 70:6059-6070, 2010.
 - 18 Alifano, M., Souazé, F., Dupouy, S., Camilleri-Broët, S., Takahashi, T., Ahmed-Zaïd, S., Cancellieri, A., Damiani, S., Boaron, M., Broët, P., Miller, L.D., Gespach, G., Regnard, J.F., and Forgez, P. Neurotensin receptor 1 determines the outcome of non-small cell lung cancer. **Clin. Cancer Res.** 16: 4401-4410, 2010.
 - 19 Bryant, C.M., Albertus, D.L., Kim, S., Guedj, M., Travis, W.D., Yatabe, Y., Takahashi, T., Brambilla, E, and Beer, D.G. Clinically relevant characterization of lung adenocarcinoma subtypes based on cellular pathways. **PLoS One** 5: e11712, 2010. doi:10.1371/journal.pone.0011712.

- 20 Miki, D., Kubo, M., Takahashi, A., Yoon, K.-A., Kim, J., Lee, G.K., Zo, J.I., Lee, J.S., Hosono, N., Morizono, T., Tsunoda, T., Kamatani, N., Chayama, K., Takahashi, T., Inazawa, J., Nakamura, Y., and Daigo, Y. Variation in TP63 is associated with lung adenocarcinoma susceptibility in Japanese and Korean populations. **Nature Genet.** 42:893-896, 2010.
- 21 Tomida, S., Takeuchi, T., Shimada, Y., Arima, C., Matsuo, K., Mitsudomi, T., Yatabe, Y., and Takahashi, T. Relapse-related molecular signature in lung adenocarcinomas identifies patients with dismal prognosis. **J. Clin. Oncol.** 27:2793-2799, 2009.
- 22 Ebi, H., Tomida, S., Takeuchi, T., Arima, C., Sato, T., Mitsudomi, T., Yatabe, Y., Osada, H., and Takahashi, T. Relationship of deregulated signaling converging onto mTOR with prognosis and classification of lung adenocarcinoma shown by two independent in silico analyses. **Cancer Res.** 69: 4027-2035, 2009
- 23 Ebi, H., Sato, T., Sugito, N., Hosono, Y., Suzuki, M., Yamaguchi, T., Yatabe, Y., Osada, H., and Takahashi, T. Counterbalancing influence of *miR-17-92* overexpression on adverse effects of RB inactivation in lung cancers. **Oncogene** 28:3371-3379, 2009.
- 24 Suzuki M, Niimi A, Limsirichaikul S, Tomida S, Huang QM, Izuta S, Usukura J, Itoh Y, Hishida T, Akashi T, Nakagawa Y, Kikuchi A, Pavlov Y, Murate T, and Takahashi T. PCNA Mono-ubiquitination and activation of translesion DNA polymerases by DNA polymerase α . **J. Biochem.** 146 : 13-21, 2009.
- 25 Yazawa, T., Sato, H., Shimoyamada, H., Okudela, K., Woo, H., Tajiri, M., Ogura, T., Ogawa, N., Suzuki, T., Mitsui, H., Ishii, J., Miyata, C., Sakaeda, M., Goto, K., Kashiwagi, K., Masuda, M., Takahashi, T., and Kitamura, H. Neuroendocrine cancer-specific up-regulating mechanism of insulin-like growth factor binding protein-2 in small cell lung cancer. **Am. J. Pathol.** 175: 976-987, 2009.
- 26 Okudera, K., Yazawa, T., Woo, T., Sakaeda, M., Ishii, J., Mitsui, H., Tajiri, M., Ogawa, N., Masuda, M., Takahashi, T., Sugimura H., and Kitamura, H. Down-regulation of DUSP6 expression in lung cancers: its mechanism and potential role in carcinogenesis. **Am. J. Pathol.** 175:867-881, 2009.
- 27 Otsuka, S., Hanibuchi, M., Ikuta, K., Yano, S., Goto, H., Ogino, H., Yamada, T., Kakiuchi, S., Nishioka, Y., Takahashi, T., and Sone, S. A bone metastasis model with osteolytic and osteoblastic properties of human lung cancer ACC-LC-319/bone 2 in natural killer cell-depleted severe combined immunodeficient mice. **Oncol. Res.** 17:581-591, 2009.
- [学会発表] (計 7 件)
- 1 Takahashi T. Metastasis-suppressing MYBPH as a novel transcriptional target of TTF-1 lineage-survival oncogene in lung adenocarcinoma. US-Japan Cancer Genomics Workshop. Kyoto, Japan. October 24-26, 2011.
 - 2 Takahashi T. miRNA alterations in the pathogenesis of human lung cancer. The 8th Nikko International Symposium. Shimotsuke, Japan. October 21, 2011.
 - 3 Takahashi, T. MicroRNA alterations in the pathogenesis of lung cancers. 8th AACR-JCA Joint Conference. Waikoloa, USA. February 5-9, 2010.
 - 4 Takahashi, T. MicroRNA alterations in the pathogenesis of lung cancers. 1st AACR-IASLC Joint Conference: Molecular Origins of Lung Cancer: Prospects for Personalized Prevention and Therapy. San Diego, USA. January 11-14, 2010.
 - 5 Takahashi, T. Multi-facetted approach for the molecular dissection of lung cancer pathogenesis. Hiroshima Cancer Seminar. Hiroshima, Japan. November 1, 2009.
 - 6 Takahashi, T. MicroRNA alterations in the pathogenesis of lung cancers. Japanese-German Cancer Workshop. Hamburg, Germany. September 16-19, 2009.
 - 7 Takahashi, T. Expression profiling-based approaches for a better understanding of human lung cancer biology. 13th World Conference on Lung Cancer, IASLC. San Francisco, USA. July 31-August 4, 2009.
- [図書] (計 0 件)
- [産業財産権]
- 出願状況 (計 0 件)
- 取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ:

<http://www.med.nagoya-u.ac.jp/molcar/jp/research.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 隆 (TAKAHASHI TAKASHI)
名古屋大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号: 50231395

(2) 研究分担者

柳澤聖 (YANAGISAWA KIYOSHI) H121-H23
名古屋大学・大学院医学系研究科・講師
研究者番号: 20372112

(3) 連携研究者

有馬千夏 (ARIMA CHINATSU) H21-H23
名古屋大学・大学院医学系研究科・COE 特
任助教
研究者番号: 00534843

後藤秀実 (GOTO HIDEMI) H21-H23
名古屋大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号: 10215501

榑野正人 (NAGINO MASATO) H21-H23
名古屋大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号: 20237564

谷田部恭 (YATABE YASUSHI)
愛知県がんセンター・研究所・主任研究員
研究者番号: 90280809

松尾恵太郎 (MATSUO KEITARO)
愛知県がんセンター・研究所・室長
研究者番号: 80393122